

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. August 2002 (01.08.2002)

PCT

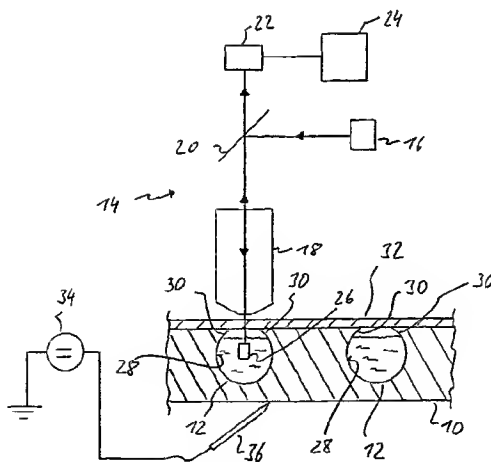
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/059582 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 21/64, (72) Erfinder; und
1/40 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EDMAN, Lars
[SE/SE]; Rålambsvägen 54, S-11256 Stockholm (SE).
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00797 RIGLER, Rudolf [AT/SE]; Handelsvägen 24, S-18256
Danderyd (SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:
25. Januar 2002 (25.01.2002) (74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach
860 820, 81635 München (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(30) Angaben zur Priorität:
101 03 304.4 25. Januar 2001 (25.01.2001) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): GNOTHIS HOLDING SA [CH/CH]; CH-1015
Ecublens (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR EXAMINING A TEST SAMPLE BY MEANS OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY, ESPECIALLY FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY, AND DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHEN, INSBESONDERE FLUORESZENZKORRELATIONSSPEKTROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG EINER MESSPROBE SOWIE EINRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DESSELBEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for examining a test sample by means of fluorescence spectroscopy, especially fluorescence correlation spectroscopy. Said test sample is introduced into a sample receiver chamber (12) which is sunk in a sample carrier (10). The electrically charged analytes contained in the test sample are then concentrated in a measuring volume (26) inside the sample volume. The measuring volume (26) is then examined. According to the invention, the defining walls (28) of the sample receiver chamber (12) are brought to an equidirectional electrostatic potential for charging the analytes, essentially over the entire surface, in order to concentrate the analytes in the measuring volume (26). An electrical molecular trap formed in such a way is very easy to carry out and is especially suitable for examining a series of test samples which are arranged, in a large number, in cavities (12) of the sample carrier (10) in a closely adjacent manner.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/059582 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Bei einem Verfahren zur fluoreszenzspektroskopischen, insbesondere fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchung einer Messprobe wird diese in eine in einem Probenträger (10) vertieft ausgebildete Probenaufnahmekammer (12) eingebracht. Sodann werden in der Messprobe enthaltene, elektrisch geladene Analyten elektrisch in einem innerhalb des Probenvolumens liegenden Messvolumen (26) konzentriert, woraufhin das Messvolumen (26) untersucht wird. Erfindungsgemäß werden zur Konzentrierung der Analyten in dem Messvolumen (26) die Begrenzungswände (28) der Probenaufnahmekammer (12) im Wesentlichen ganzflächig auf ein zur Ladung der Analyten gleichsinniges elektrostatisches Potential gebracht. Eine so gebildete elektrische Molekülfalle lässt sich sehr einfach realisieren und eignet sich besonders für Reihenuntersuchungen von Messproben, die in großer Vielzahl eng nebeneinander in Vertiefungen (12) des Probenträgers (10) angeordnet sind.

Verfahren zur fluoreszenzspektroskopischen, insbesondere fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchung einer Messprobe sowie Einrichtung zur Durchführung desselben

Die Erfindung befasst sich mit der fluoreszenzspektroskopischen, insbesondere fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchung einer Messprobe.

Mittels Fluoreszenzspektroskopie kann das Vorhandensein bestimmter Analyten in einer Messprobe, beispielsweise einer biologischen Probe, z.B. einer Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Speichel etc., oder einem molekularbiologischen Reaktionsansatz, z.B. einem Sequenzierungsansatz, nachgewiesen werden. Bei den Analyten kann es sich um niedermolekulare Substanzen, wie Arzneimittel, Hormone, Nukleotide, Metaboliten etc., oder hochmolekulare Substanzen, wie Proteine, Zucker, Nukleinsäuren etc., Viren oder Zellen, wie Bakterienzellen, und sonstige Substanzen handeln. Um die gesuchten Analyten identifizieren zu können, werden sie mit fluorophor-tragenden Reagenzien markiert, die bei Licht-, insbesondere Laserbestrahlung Fluoreszenzsignale aussenden, welche detektiert und ausgewertet werden. In der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie werden hierbei Auto- oder/und Kreuzkorrelationen der detektierten Fluoreszenzsignale ausgewertet. Nähere Informationen zur Fluoreszenzspektroskopie und insbesondere zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie können beispielsweise der EP 0 679 251 B1 entnommen werden.

Im Fokus des zur Untersuchung verwendeten Mikroskops liegt regelmäßig nur ein kleines Teilvolumen der Probe - das Messvolumen. Damit die fluoreszierenden Moleküle nicht durch zu intensive und lange Lichtbestrahlung ausbleichen und die Messungen verfälschen, ist man bestrebt, dieses Messvolumen ultraklein zu machen, beispielsweise im Femtoliter-

- 2 -

bereich. Wenn die zu identifizierenden Analyten jedoch nur in sehr geringer Konzentration in der Messprobe vorhanden sind, kann es bei derart kleinen Messvolumina vergleichsweise lange und für Reihenuntersuchungen im Großmaßstab sogar unakzeptabel lange dauern, bis einer der
5 gesuchten Analyten in das Messvolumen diffundiert und dadurch beobachtbar wird.

Zur Beschleunigung der Messung wurden deshalb in der einschlägigen Fachliteratur und unter anderem auch in der oben erwähnten europäischen Druckschrift EP O 679 251 B1 elektrische Molekülfallen vorgeschlagen, mittels der die nachzuweisenden Analyten, sofern sie elektrisch
10 geladen sind, unter dem Einfluss elektrischer Felder in das Messvolumen getrieben und dort konzentriert werden können. Aus der EP O 679 251 B1 ist es beispielsweise bekannt, die gesuchten Analyten mittels eines
15 rotierenden elektrischen Wechselfelds in dem Messvolumen zu halten. Quer zu diesem Wechselfeld werden sie durch zwei elektrisch gleichsinnig geladene Pole am Verlassen des Messvolumens gehindert. In der DE 195 08 366 C2 wird vorgeschlagen, zwischen einer Ringelektrode und einer mit ihrer Spitze im Zentrum der Ringelektrode angeordneten Kapillare ein elektrisches Feld zu erzeugen, das die Konzentrierung der gesuchten Analyten um die Kapillarspitze herum bewirkt.
20

Solche Molekülfallen eignen sich allein schon aufgrund des Platzbedarfs der zur Erzeugung der elektrischen Felder benötigten Elektroden, aber
25 auch aufgrund des häufig erforderlichen hohen Aufwands für die elektrische Steuerung der Elektroden vorwiegend für Einzeluntersuchungen. Sie erweisen sich aber als wenig geeignet, wenn im Rahmen von Reihenuntersuchungen eine große Anzahl von Messproben, beispielsweise mehrere Tausend bis hin zu einigen Hunderttausend, die in eng benachbarten
30 Vertiefungen eines gemeinsamen Probenträgers angeordnet sind (etwa einer aus der EP O 679 251 B1 bekannten Multi-Well-Folie), mit vertretbarem Aufwand untersucht werden sollen.

- 3 -

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, einen einfacheren Weg der elektrischen Konzentrierung von Analyten anzugeben.

Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung aus von einem Ver-
fahren zur fluoreszenzspektroskopischen, insbesondere fluoreszenzkorre-
lationsspektroskopischen Untersuchung einer Messprobe, bei welchem
Verfahren die Messprobe in eine in einem Probenträger vertieft ausgebil-
dete Probenaufnahmekammer eingebracht wird, sodann in der Messprobe
enthaltene, elektrisch geladene Analyten elektrisch in einem innerhalb des
Probenvolumens liegenden Messvolumen konzentriert werden und das
Messvolumen untersucht wird.

Erfindungsgemäß ist bei diesem Verfahren vorgesehen, dass zur Konzen-
trierung der Analyten in dem Messvolumen die Begrenzungswände der
Probenaufnahmekammer im Wesentlichen ganzflächig auf ein zur Ladung
der Analyten gleichsinniges elektrostatisches Potential gebracht werden.
Infolge der auf die Begrenzungswände der Probenaufnahmekammer auf-
gebrachten elektrischen Ladung werden Abstoßungskräfte auf die gleich-
sinnig geladenen Analyten in der Messprobe ausgeübt. Bei geeigneter
Gestaltung der Probenaufnahmekammer führt diese Abstoßung dazu,
dass sich die Analyten gezielt zu dem Messvolumen hinbewegen und
dort ansammeln. Es hat sich gezeigt, dass auf diese Weise Analyten,
deren Konzentration in der Messprobe unterhalb des nM-Bereichs bis
hinunter zum aM-Bereich liegt, im Messvolumen ohne weiteres auf Werte
im nM-Bereich angereichert werden können, so dass das Vorhandensein
dieser Analyten innerhalb vertretbarer Messzeiten (beispielsweise in weni-
ger als einer Sekunde) nachgewiesen werden kann.

Wenn hier von einem Ladungssinn der Analyten die Rede ist, zu dem das
Wandpotential der Probenaufnahmekammer gleichsinnig sein soll, so ver-
steht es sich, dass hierunter der Ladungssinn der fluorophor-markierten

- 4 -

Analyten verstanden wird, da es diese sind, die im Messvolumen konzentriert werden sollen.

Bei der erfindungsgemäßen Lösung ist keine komplizierte und platzraubende Elektrodenanordnung erforderlich. Vielmehr dienen die Wände der Probenaufnahmekammer selbst als Elektrode. Um diese Wände elektrostatisch zu laden, kann eine einmalige Ladungsaufbringung genügen; zumindest für die Messzeit werden die Kammerwände die Ladung im Regelfall ohne besondere Zusatzmaßnahmen halten können. Es ist aber auch denkbar, dass die Kammerwände während der gesamten Messzeit ständig mit einer Potentialquelle verbunden sind. Es ist auch keine Steuerung des Potentials der Kammerwände erforderlich. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, die Analyten zuverlässig im Messvolumen einzufangen, ohne dabei rückgekoppelt das Potential der Kammerwände dynamisch verändern zu müssen. Es ist noch nicht einmal ein zeitlich konstantes Wandpotential erforderlich. Dieses muss lediglich so hoch sein, dass hinreichend starke Abstoßungskräfte erzeugt werden, um die gewünschte Konzentrierung der Analyten zu erreichen. Ein eventueller Ladungsabfluß von den Kammerwänden kann deshalb tolerierbar sein, solange das Grundniveau des Wandpotentials ausreichend hoch ist.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt betrifft die Erfindung eine Einrichtung zur Durchführung des vorstehenden Verfahrens. Diese Einrichtung umfasst einen Probenträger mit mindestens einer vertieft in diesem ausgebildeten Probenaufnahmekammer sowie Mittel zur im Wesentlichen ganzflächigen elektrostatischen Aufladung der Begrenzungswände der Probenaufnahmekammer.

Die Probenaufnahmekammer kann hinterschnitten ausgebildet sein. Dies kann helfen, um innerhalb des Volumens der Messprobe einen Punkt des Coulomb'schen Kräftegleichgewichts zu erhalten. Es ist jedoch nicht grundsätzlich notwendig, einen solchen Gleichgewichtspunkt innerhalb

des Volumens der Messprobe zu haben. Es ist denkbar, dass ein Punkt des Kraftgleichgewichts erst oberhalb des Füllniveaus liegt, bis zu dem die Messprobe die Probenaufnahmekammer ausfüllt. Es ist sogar vorstellbar, dass die Probenaufnahmekammer so gestaltet ist, dass überhaupt
5 kein Punkt des Coulomb'schen Kräftegleichgewichts existiert. Da die Abstoßungskräfte die Analyten in Richtung zu niedrigeren elektrostatischen Potentialen treiben, sollte lediglich sichergestellt sein, dass das Messvolumen in einem Bereich niedrigsten elektrostatischen Potentials innerhalb des Gesamtvolumens der Messprobe liegt. Aus diesem Grund
10 kann auch eine hinterschneidungsfreie Probenaufnahmekammer verwendet werden.

Um bei Reihenuntersuchungen die Prozedur zur elektrostatischen Aufladung der Kammerwände möglichst ökonomisch zu gestalten, kann der
15 Probenträger eine Vielzahl vorzugsweise matrixförmig angeordneter Probenaufnahmekammern aufweisen, deren Begrenzungswände gemeinsam elektrostatisch aufladbar sind. Es versteht sich jedoch, dass auch ein Probenträger mit einer Vielzahl von Probenaufnahmekammern verwendet werden kann, deren Kammerwände wenigstens zum Teil individuell elektrostatisch aufladbar sind.
20

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es stellen dar:

25 Fig. 1 schematisch eine Draufsicht auf einen Probenträger und

Fig. 2 schematisch eine Messanordnung zur Untersuchung einer Messprobe, die sich in einer Probenaufnahmekammer des Probenträgers befindet.

30

Der in Fig. 1 gezeigte und dort mit 10 bezeichnete flächige Probenträger weist in einer Matrixanordnung eine Vielzahl durch schwarze Punkte

- 6 -

angedeuteter Probenaufnahmekammern 12 auf, in die Blutproben oder Proben anderer Lösungen eingefüllt werden können, welche auf das Vorhandensein bestimmter Viren, DNA-Fragmente oder anderer Analyten untersucht werden sollen. Die Probenaufnahmekammern 12 sind von
5 Vertiefungen oder Aushöhlungen in dem Probenträger 10 gebildet.

Die Größe der Probenaufnahmekammern 12 wird man abhängig von der beabsichtigten Anwendung des betreffenden Probenträgers 10 wählen. So kann das Volumen jeder Probenaufnahmekammer 12 beispielsweise
10 zwischen 100 fl und 100 μ l liegen. Entsprechend groß ist der Bereich der pro Flächeneinheit des Probenträgers 10 unterzubringenden Probenaufnahmekammern 12. Pro cm^2 des Probenträgers 10 können dabei ohne weiteres zwischen 100 und 100 000 Probenaufnahmekammern 12 untergebracht sein. Der Probenträger 10 kann beispielsweise aus einem Folien-
15 material hergestellt sein. Er kann aber auch als Plattenteil ausgebildet sein.

Im Rahmen einer Reihenuntersuchung von Messproben verschiedener Patienten kann beispielsweise für jeden Patienten je eine Spalte der Matrix von Probenaufnahmekammern 12 reserviert werden. Die in die Pro-
20 benaufnahmekammern 12 eingefüllten Messproben werden dann zeilenweise mit unterschiedlichen Testlösungen gemischt. Jede Testlösung enthält dabei unterschiedliche analytspezifische Reagenzien, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Von Zeile zu Zeile können so
25 unterschiedliche Analyten nachgewiesen werden.

Zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Messproben dient die in Fig. 2 gezeigte Messanordnung. Diese umfasst eine allgemein mit
14 bezeichnete Mikroskopanordnung mit einer Laserquelle 16, einer Optik
30 18, einem dichroitischen Spiegel 20, einem Photonendetektor 22 und einer Auswerteeinheit 24. Der von der Laserquelle 16 bereitgestellte Laserstrahl wird über den Spiegel 20 in die Optik 18 eingespeist und von

- 7 -

dieser auf ein bei 26 angedeutetes kleines Volumenelement innerhalb des Volumens der in die betreffende Probenaufnahmekammer 12 eingefüllten Messprobe fokussiert. Über die Optik 18 und ggf. eine nicht näher dargestellte Lochblende wird dieses Volumenelement 26 konfokal auf den
5 Detektor 22 abgebildet. Der Laserstrahl regt die in dem Volumenelement 26 befindlichen (freien oder an die gesuchten Analyten gebundenen) Fluorophore zu Fluoreszenz an. Die dabei erzeugten Lichtimpulse werden vom Detektor 22 registriert und in der Auswerteeinheit 24 ausgewertet. Der Nachweis der gesuchten Analyten geschieht dabei bevorzugt über
10 Auto- oder/und Kreuzkorrelationen der vom Detektor 22 gelieferten Fluoreszenzsignale.

Konfokale Mikroskopanordnungen dieser Art sind an sich bekannt. Beispielshaft wird auf die EP O 679 251 B1 verwiesen, der Einzelheiten eines
15 solchen Mikroskops entnommen werden können. Es versteht sich, dass die Mikroskopanordnung 14 zur Erfassung verschiedener Fluoreszenzwellenlängen auch zwei oder mehr Detektoren 22 aufweisen kann. Sie kann auch als Doppelmikroskop mit zwei beidseits des Probenträgers 10 angeordneten Optiken 18 ausgebildet sein, sofern der Probenträger 10 aus
20 einem lichtdurchlässigen Material besteht. Ein solches Doppelmikroskop kann ebenfalls der EP O 679 251 B1 entnommen werden.

Um die Konzentration der nachzuweisenden Analyten in dem Volumenelement 26 zu erhöhen und dadurch die Messzeit zu verkürzen, wird die
25 mit 28 bezeichnete Innenwand der betreffenden Probenaufnahmekammer 12 ganzflächig auf ein elektrostatisches Potential aufgeladen, das gleichsinnig (positiv oder negativ) zur elektrischen Ladung der gesuchten Analyten ist. DNA-Stränge beispielsweise sind im Regelfall negativ geladen; die Kammerinnenwand 28 wird in diesem Fall daher negativ geladen. Die
30 infolge der Aufladung an die Kammerinnenwand 28 gebrachten elektrischen Ladungsträger üben Coulomb'sche Abstoßungskräfte auf alle gleichsinnig geladenen Moleküle und sonstigen Teilchen in der Messprobe

- 8 -

und somit auch auf die gesuchten Analyten aus. Diese Abstoßungskräfte treiben die Analyten längs des in der Probenaufnahmekammer 12 herrschenden Potentialgradienten zu Bereichen niedrigeren elektrostatischen Potentials hin. In dem Bereich, der innerhalb des Messprobenvolumens das geringste elektrostatische Potential aufweist, sammeln sich die Analyten schließlich an. Einen besonders steilen Potentialgradienten und damit einen besonders effektiven und raschen Konzentrierungsvorgang erhält man, wenn sich an dem Ort, dessen elektrostatisches Potential innerhalb des Messprobenvolumens am geringsten ist, zugleich die vektoriell addierten Abstoßungskräfte, die von den über die Kammerinnenwand 28 verteilten Ladungsträgern ausgeübt werden, gegenseitig aufheben, an diesem Ort also ein Gleichgewicht der Coulomb'schen Kraft existiert.

Um zu erreichen, dass ein Punkt solchen Kraftgleichgewichts innerhalb der Probenaufnahmekammer 12 und vorzugsweise sogar innerhalb des Messprobenvolumens existiert, können die Probenaufnahmekammern 12 mit Hinterschnitt ausgeführt sein. Bei dieser Ausbildung werden die Probenaufnahmekammern 12 von den mit 30 bezeichneten Randbereichen ihrer Öffnungen teilweise überragt oder überlappt, wie in Fig. 2 gut erkennbar ist. In diesen Randbereichen 30 gehen bei elektrostatischer Aufladung der Kammerinnenwand 28 Abstoßungskräfte mit einer zum Boden der Probenaufnahmekammer 12 gerichteten Komponente aus, die den aus der Probenaufnahmekammer 12 heraus gerichteten Abstoßungskräften entgegenwirkt und so die Etablierung eines Kraftgleichgewichts innerhalb der Probenaufnahmekammer 12 ermöglicht.

Zum Kammerboden gerichtete Kraftkomponenten können beispielsweise auch durch elektrostatische Aufladung eines Abdeckelements 32, vorzugsweise einer Abdeckfolie, erzeugt werden, mittels welchem die Öffnungen der Probenaufnahmekammern 12 abgedeckt werden können.

Falls innerhalb des Messprobenvolumens kein Punkt des Kraftgleichgewichts existiert (entweder weil ein solcher Punkt nur außerhalb des Messprobenvolumens existiert oder weil er überhaupt nicht existiert), so werden die Abstoßungskräfte für eine Konzentration der nachzuweisen-

5 den Analyten in einem Bereich nahe der Oberfläche der Messprobe sorgen. Aus diesem Grund ist es durchaus möglich, hinterschneidungsfreie Probenaufnahmekammern 12a zu verwenden, wie beispielhaft in Fig. 3 gezeigt ist. Gleiche Elemente wie in Fig. 2 sind dort mit gleichen Bezugszeichen versehen, jedoch ergänzt um einen Kleinbuchstaben.

10

Die elektrostatische Aufladung der Kammerinnenwände 28 der Probenaufnahmekammern 12 kann beispielsweise mittels einer an eine Gleichspannungsquelle 34 angeschlossenen Elektrode 36 erfolgen, die in Kontakt mit dem Probenträger 10 gebracht wird. Falls der Probenträger 10

15 aus einem elektrisch leitfähigen Material gefertigt ist, kann die Elektrode 36 an irgendeiner Stelle mit dem Probenträger 10 kontaktiert werden. In diesem Fall könnten alle Probenaufnahmekammern 12 gleichzeitig gemeinsam geladen werden. Vorstellbar ist aber auch, dass der Probenträger 10 aus einem nichtleitenden Grundmaterial besteht, die Probenauf-

20 nahmekammern 12 jedoch innenseitig mit einem leitenden Material beschichtet sind. Auf diese Weise könnten die Probenaufnahmekammern 12 einzeln aufladbar sein.

25

Das auf Erdpotential bezogene elektrische Potential zur Aufladung der Kammerinnenwände 28 hängt von den Abmessungen der Probenaufnahmekammern 12 und von der Höhe des gewünschten Konzentrationsgradienten der betreffenden Analyten in den Probenaufnahmekammern 12 ab. Der Bereich der zur Anwendung kommenden Potentialdifferenzen kann durchaus zwischen 10 V und 10 000 V liegen.

- 10 -

Ansprüche

1. Verfahren zur fluoreszenzspektroskopischen, insbesondere fluo-
reszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchung einer Mess-
5 probe, bei welchem Verfahren die Messprobe in eine in einem
Probenträger (10) vertieft ausgebildete Probenaufnahmekammer
(12) eingebracht wird, in der Messprobe enthaltene, elektrisch
geladene Analyten elektrisch in einem innerhalb des Probenvolu-
mens liegenden Messvolumen (26) konzentriert werden und das
10 Messvolumen (26) untersucht wird,
dadurch gekennzeichnet, dass zur Konzentrierung der Analyten in
dem Messvolumen (26) die Begrenzungswände (28) der Proben-
aufnahmekammer (12) im Wesentlichen ganzflächig auf ein zur
Ladung der Analyten gleichsinniges elektrostatisches Potential
15 gebracht werden.
2. Einrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1,
gekennzeichnet durch einen Probenträger (10) mit mindestens
einer vertieft in diesem ausgebildeten Probenaufnahmekammer
20 (12) sowie Mittel (34, 36) zur im Wesentlichen ganzflächigen
elektrostatischen Aufladung der Begrenzungswände (28) der Pro-
benaufnahmekammer (12).
3. Einrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die
25 Probenaufnahmekammer (12) hinterschnitten ist.
4. Einrichtung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die Probenaufnahmekammer (12a) hinterschneidungsfrei ist.
- 30 5. Einrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekenn-
zeichnet, dass der Probenträger (10) eine Vielzahl vorzugsweise
matrixförmig angeordneter Probenaufnahmekammern (12) auf-

- 11 -

weist, deren Begrenzungswände (28) gemeinsam elektrostatisch aufladbar sind.

1/2

Fig. 1

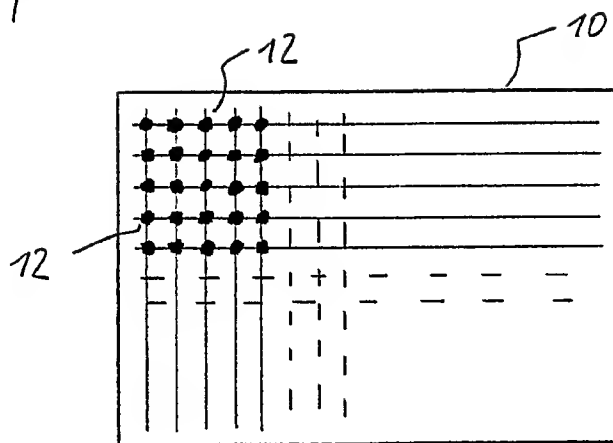
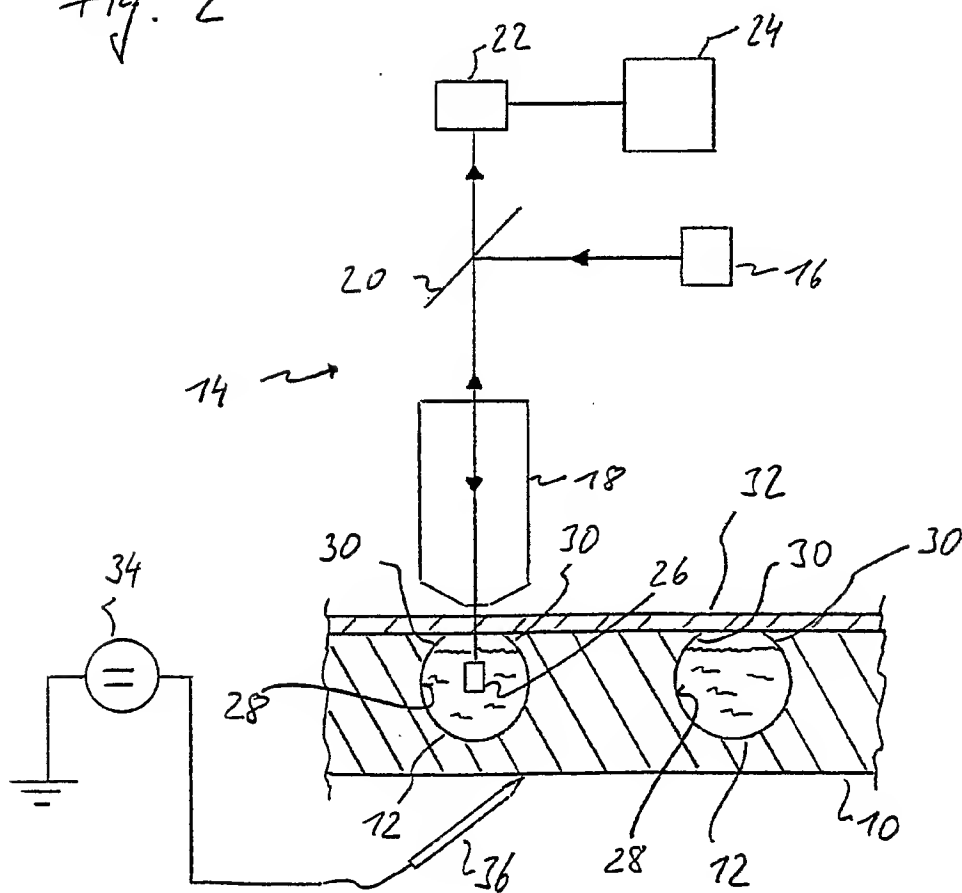
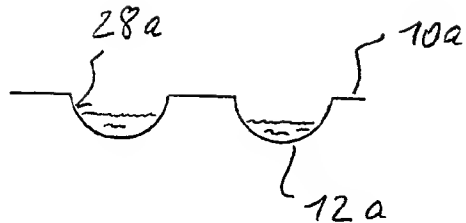


Fig. 2



2/2

Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/00797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N21/64 G01N1/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 679 251 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 2 November 1995 (1995-11-02) cited in the application column 23, line 3-6 column 23, line 38-55 column 26, line 20-28 column 32, line 45 -column 33, line 12 column 38, line 39-54 column 39, line 27 -column 40, line 23 column 60, line 49 -column 61, line 24 figures 6,13,20,21 ---	1,2
A	DE 195 08 366 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 12 September 1996 (1996-09-12) cited in the application column 10, line 4 -column 11, line 10 column 13, line 30 -column 14, line 26; figure 2 --- -/-	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 June 2002

Date of mailing of the international search report

17/06/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Meyer, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/00797

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EIGEN M ET AL: "SORTING SINGLE MOLECULES: APPLICATION TO DIAGNOSTICS AND EVOLUTIONARY BIOTECHNOLOGY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 91, 1 June 1994 (1994-06-01), pages 5740-5747, XP002029412 ISSN: 0027-8424 page 5745, left-hand column, last paragraph -page 5746, left-hand column, paragraph 3; figure 8 -----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/00797

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0679251	A	02-11-1995	DE 4301005 A1	21-07-1994
			EP 0679251 A1	02-11-1995
			AT 164943 T	15-04-1998
			AU 5884394 A	15-08-1994
			DE 59405644 D1	14-05-1998
			DK 679251 T3	25-01-1999
			WO 9416313 A2	21-07-1994
			ES 2116578 T3	16-07-1998
			JP 11502608 T	02-03-1999
<hr/>				
DE 19508366	A	12-09-1996	DE 19508366 A1	12-09-1996
			EP 0731173 A2	11-09-1996
			JP 8242858 A	24-09-1996
			US 5807677 A	15-09-1998
<hr/>				

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N21/64 G01N1/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 679 251 A (EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH) 2. November 1995 (1995-11-02) in der Anmeldung erwähnt Spalte 23, Zeile 3-6 Spalte 23, Zeile 38-55 Spalte 26, Zeile 20-28 Spalte 32, Zeile 45 -Spalte 33, Zeile 12 Spalte 38, Zeile 39-54 Spalte 39, Zeile 27 -Spalte 40, Zeile 23 Spalte 60, Zeile 49 -Spalte 61, Zeile 24 Abbildungen 6,13,20,21 ---	1,2
A	DE 195 08 366 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 12. September 1996 (1996-09-12) in der Anmeldung erwähnt Spalte 10, Zeile 4 -Spalte 11, Zeile 10 Spalte 13, Zeile 30 -Spalte 14, Zeile 26; Abbildung 2 --- -/-	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

1 Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juni 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/06/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Meyer, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EIGEN M ET AL: "SORTING SINGLE MOLECULES: APPLICATION TO DIAGNOSTICS AND EVOLUTIONARY BIOTECHNOLOGY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 91, 1. Juni 1994 (1994-06-01), Seiten 5740-5747, XP002029412 ISSN: 0027-8424 Seite 5745, linke Spalte, letzter Absatz -Seite 5746, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 8</p> <p>-----</p>	1,2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00797

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0679251	A	02-11-1995	DE	4301005 A1	21-07-1994
			EP	0679251 A1	02-11-1995
			AT	164943 T	15-04-1998
			AU	5884394 A	15-08-1994
			DE	59405644 D1	14-05-1998
			DK	679251 T3	25-01-1999
			WO	9416313 A2	21-07-1994
			ES	2116578 T3	16-07-1998
			JP	11502608 T	02-03-1999
DE 19508366	A	12-09-1996	DE	19508366 A1	12-09-1996
			EP	0731173 A2	11-09-1996
			JP	8242858 A	24-09-1996
			US	5807677 A	15-09-1998